UNTERSUCHUNGEN ZUR SPEZIESSPEZIFITÄT DES INSULINREZEPTORS

Wechselwirkungen zwischen Insulinen und Rezeptoren der Lebermembranen von Meerschweinchen, Kalb und Huhn

Anatol Zynamon

1980

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Aus dem Institut für Diabetesforschung in München
III. Medizinische Abteilung Krankenhaus München Schwabing

Direktor: Prof. Dr. H. Mehnert

UNTERSUCHUNGEN ZUR SPEZIESSPEZIFITÄT DES INSULINREZEPTORS

Wechselwirkungen zwischen Insulinen und Rezeptoren der Lebermembranen von Meerschweinchen, Kalb und Huhn

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Anatol Zynamon
aus
München

Jahr
1980

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. W.Kemmler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Mehnert

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 2. 1980

UNIV. LEIDEN BIBL.

Herrn Professor Dr. H. Mehnert danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit.

Herrn Priv. Doz. Dr. W. Kemmler danke ich für das Interesse, das er meiner Arbeit jederzeit entgegenbrachte sowie für seine vielen Anregungen und Diskussionen.

Herrn Dr. R. Renner danke ich für seine Anleitungen.

Gedankt sei auch an dieser Stelle allen Mitarbeitern des Instituts für Diabetesforschung.

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG 1

MATERIAL 5

Geräte 5

Substanzen 6

Plastikartikel 7

Tiere 8

METHODEN 9

Proteinbestimmung nach Biuret 9

Proteinbestimmung nach Lowry 9

Enzymbestimmungen 10

Succinatdehydrogenase 10

$(Na^+ + K^+)$ATPase 10

Phosphatbestimmung nach Fiske und SubbaRow 11

5'-Nukleotidase 11

Alkalische Phosphatase 12

Lebermembranen nach Neville 13

Lösungen zur Durchführung der Präparation 13

Präparationsschritte 13

Lebermembranen nach Cuatrecasas 15

Lipogenese von 2-(^{3}H)Glukose in isolierten Fettzellen nach Moody 16

Lösungen 16

Aufbereitung der Zellen 17

Messung der Lipogenese 17

Inkubationsansatz für Lebermembranen 18

Methode zur Trennung von gebundenem und ungebundenem Insulin 19

Fettzellen nach Glieman 19

Lebermembranen 19

Filtrationsmethode 19

Ölmethode 20

Waschmethode 21

Ultrazentrifugationsmethode 23

ERGEBNISSE 24

Überprüfung der Qualität des radioaktiv markierten Insulins 24

Überprüfung der Methode zur Trennung von gebundenem und ungebundenem Insulin 24

Leitenzyme 27

Nachweis erhöhter Bindung von Puteninsulin an Rattenlebermembranen 30

Grundcharakteristika der Rezeptoren von Rattenlebermembranen 30

Charakterisierung der Rezeptoren von Meerschweinchen-, Hühner- und Kalbslebermembranen 32

Einfluß der drei verschiedenen Speziesinsuline auf die Insulinbindung an Lebermembranen von Meerschweinchen, Huhn und Kalb 39

DISKUSSION 45

Diskussion der Methoden 45

Diskussion der Ergebnisse 50

ZUSAMMENFASSUNG 57

LITERATURVERZEICHNIS 61

TABELLEN

1. Spezifische Aktiviät der Leitenzyme im Homogenat und in den gereinigten Plasmamembranen der Lebern der drei Tierspezies 28

2. Totale Bindungskapazität und Affinitätskonstanten für Rinderinsulin an Plasmalebermembranen von Meerschweinchen, Kalb und Huhn 43

ABBILDUNGEN

1. Vorgehen beim Bindungsversuch 22

2. Überprüfung der biologischen Gleichwertigkeit von nativem Rinderinsulin und ^{125}J-Rinderinsulin im Lipogenesetest an Fettzellen der Ratte 25

3. Vergleich der verschiedenen Methoden zur Trennung von gebundenem und ungebundenem Insulin 26

4. Verdrängung von ^{125}J-Rinderinsulin durch Rinderinsulin und Puteninsulin an Rattenlebermembranen nach Neville 31

5. Temperaturabhängigkeit der Bindung von ^{125}J-Rinderinsulin an Rattenlebermembranen nach Neville 33

6. Proteinabhängigkeit der Insulinbindung an Rattenlebermembranen nach Neville 34

7. Zeitabhängigkeit der Insulinbindung an Rattenlebermembranen nach Neville 35

8. Zeitabhängigkeit der spezifischen Insulinbindung an Leberplasmamembranen von Huhn, Meerschweinchen und Kalb 36

9. Temperaturabhängigkeit der spezifischen Insulinbindung an Leberplasmamembranen von Huhn, Meerschweinchen und Kalb 37

10. pH-Abhängigkeit der spezifischen Insulinbindung an Leberplasmamembranen von Huhn, Meerschweinchen und Kalb 38

11. Verdrängung von ^{125}J-Rinderinsulin durch verschiedene Konzentrationen von Meerschweincheninsulin, Rinderinsulin und Hühnerinsulin an Leberplasmamembranen von Huhn, Meerschweinchen und Kalb 40

12. Scatchard plot der Bindung von ^{125}J-Rinderinsulin an Leberplasmamembranen von Meerschweinchen, Huhn und Kalb 42

EINLEITUNG

Der Wirkungsmechanismus des Insulins ist im einzelnen noch nicht bekannt. Es wird heute angenommen, daß die biologische Wirkung des Insulins über einen spezifischen Rezeptor an der Zellmembran vermittelt wird. In den letzten Jahren sind eine Vielzahl von Arbeiten über die Charakterisierung dieses primären Wirkortes des Insulins veröffentlicht worden. Ausführliche zusammenfassende Artikel erschienen in letzter Zeit von verschiedenen Autoren (13,21,42).

Wesentliche Fortschritte in der Erforschung der Rezeptoren für Proteohormone hat die Entwicklung von radioaktiv markierten Hormonen gebracht, die dem nativen Hormon in allen wesentlichen Eigenschaften entsprechen (11,19). Die Verdrängbarkeit dieser radioaktiv markierten Hormone vom Rezeptor durch unmarkiertes Hormon hat es möglich gemacht, die Eigenschaften der Bindung näher zu erforschen.

Das Protein Insulin hat die Eigenschaft, an sehr verschiedenartige, auch nicht biologische Oberflächen, wie zum Beispiel Talk oder Glas zu binden. Aus der Insulinbindung allein kann also nicht auf das Vorliegen eines spezifischen Insulinrezeptors geschlossen werden. Die eigentliche Beweisführung für die Existenz eines biologischen Rezeptors läge darin, die Insulinbindung direkt mit der biologischen Aktivität in Verbindung zu bringen.

Bisher steht jedoch aus methodischen Gründen ein solcher direkter Beweis für die biologische Bedeutung des Rezeptors aus. Zwar ist es gelungen, den Insulinrezeptor teilweise zu reinigen (5,6), aber eine Koppelung dieses Rezeptors mit der biologischen Wirkung in vitro ist noch nicht möglich. Indirekte Hinweise erlauben jedoch die Annahme, daß es sich bei der Bindung des Insulins an Membranen um eine spezifische Hormonbindung handelt, die die Hormonwirkung an die Zelle vermittelt (21).

Um eine Insulinbindung als spezifische Rezeptorbindung zu charakterisieren, wurden daher verschiedene Kriterien aufgestellt:
Die Insulinbindung muß eine Sättigungskinetik zeigen, sie muß temperatur- und zeitabhängig sein, eine Reversibilität der Bindung ist ebenso zu fordern wie eine Spezifität für das Hormon. Als wesentliches Kriterium, das auf die biologische Funktion des Rezeptors hinweist, muß gezeigt werden, daß die Affinität verschiedener Insulinarten zum Rezeptor ihrer jeweiligen biologischen Aktivität entspricht. So konnte eine Reihe Autoren zeigen, daß Insuline verschiedener Tierspezies mit gegenüber Rinderinsulin erniedrigter biologischer Aktivität auch eine erniedrigte Affinität zum Rezeptor aufweisen (10). So ist zum Beispiel das Meerschweincheninsulin mit einer gegenüber Rinderinsulin vierzigfach geringeren biologischen Aktivität auch nur in vierzigfach höherer Konzentration in der Lage, dieselbe Menge radioaktiv markierten Rinderinsulins vom Rezeptor so zu verdrängen wie Rinderinsulin selbst.

Dieselbe Korrelation zwischen biologischer Aktivität und Rezeptoraffinität wurde auch für alle bekannten chemisch abgewandelten Insuline gezeigt (12).

Das einzige bisher bekannte Insulin, das gegenüber dem Rinderinsulin eine erhöhte biologische Affinität aufweist, ist das Hühnerinsulin bzw. das Puteninsulin, deren Aminosäurensequenz identisch ist (47,54). In jüngster Zeit ist der Nachweis gelungen, daß die Ursache dieser erhöhten biologischen Aktivität in einer erhöhten Bindungsaffinität an den Rezeptor begründet ist (39). Die entsprechenden Bindungsexperimente mit Insulinen verschiedener Tierspezies und chemisch abgewandelten Insulinen wurden an Membranen der Rattenleber, am Herz- und Fettgewebe der Ratte, sowie auch an menschlichen Lymphozyten durchgeführt (10, 15,39,43,45). Es gibt nur vereinzelte Berichte über Untersuchungen der Bindung von Tierspeziesinsulinen am homologen Rezeptor. So wurden Bindungsstudien mit Hühnerinsulin an Lebermembranen von Hühnern, Hepatozyten und Erythrozyten als auch mit menschlichem Insulin an menschlichen Lymphozyten durchgeführt (15,45). Es gab auch Studien mit dem Insulin des atlantischen Schleimfisches an dessen Erythrozyten (32). Bisher war es jedoch nicht ganz klar, ob die Rezeptoren der Tiere mit biologisch unterschiedlicher Insulinaktivität eine speziesspezifische Affinität zum homologen Insulinmolekül zeigen. Deshalb erschien es uns von großem

Interesse,Vergleichsstudien mit Hühner-, Kälber- und Meerschweincheninsulinen an Lebermembranen dieser drei Spezies durchzuführen.
Aus der Beobachtung der verschiedenen Bindungsaffinitäten der Insuline unterschiedlicher Tierspezies ergibt sich die Frage, ob die Rezeptoren von Tieren mit Insulinen unterschiedlicher biologischer Aktivität eine spezies-spezifische Affinität zum homologen Insulinmolekül aufweisen. Eine Speziesspezifität der Insulinrezeptoren könnte den unterschiedlichen biologischen Effekt der Insuline ausgleichen.

Um diese Frage zu beantworten, wurde die Bindung von Rinderinsulin und einem stärker wirksamen Insulin, dem Hühnerinsulin einerseits, und einem schwächer wirksamen Insulin, dem Meerschweincheninsulin andererseits, an den Lebermembranen dieser drei Tierspezies untersucht. Außerdem wurden die Grundcharakteristika, wie pH-, Zeit- und Temperaturabhängigkeit der verschiedenen Speziesrezeptoren von Lebermembranen herausgearbeitet. Um die Insulinbindung zu messen, wurde eine neue Methode zur Trennung von gebundenem und ungebundenem Insulin erarbeitet und mit den bisher üblichen Methoden kritisch verglichen.

MATERIAL

1. Geräte

Waage Mettler P 160

Analysenwaage Typ H 15

Fa. Spoerhase AG

D-6300 Gießen, Deutschland

pH - Meter

Fa. L. Pusl

D-8000 München, Deutschland

Dounce Homogenisator

Fa. Neumann

D-8000 München, Deutschland

Zeiss Refraktometer

Carl Zeiss

D-7082 Oberkochen, Deutschland

Filtrationsgerät

Fa. Hölzel

D-8000 München, Deutschland

Sorvall Kühlzentrifuge "Superspeed RC 2 - B"

Ivan Sorvall Inc.

Norwalk Connecticut USA

Eppendorf Zentrifuge 3200

Eppendorf Thermostat 3401

Eppendorf Rotationsmischer 3300

Eppendorf Photometer 1101 M mit Küvettenwechsel-
automat 2705 und Kompensationsschreiber 6511

Eppendorf Gerätebau Netheler & Hinz GmbH

D-2000 Hamburg, Deutschland

Szintillationszähler Modell 3385

Packard GmbH

D-6000 Frankfurt/Main, Deutschland

Teletypewriter Modell 33

Teletype Corporation

Illinois USA

Beckman Ultrazentrifuge "Spinco L2 - 65 B"

Beckman Mikrofuge 152

Fa. Beckman

D-8000 München, Deutschland

2. Substanzen

2.1 Isotopenmarkierte Verbindungen

Radiochemical Center, Amersham Buchler GmbH

D-3300 Braunschweig, Deutschland

^{125}J-Insulin

NOVO Company

Kopenhagen, Dänemark

2.2 Organische Verbindungen

Monokomponentinsulin vom Rind

Kristallines Meerschweincheninsulin

Glukagon

NOVO Company

Kopenhagen, Dänemark

Oxytozin

Fa. Serva Feinbiochemica

D-6900 Heidelberg, Deutschland

Humanalbumin

Schweizer Rotes Kreuz

Bern, Schweiz

2.3 Organische und anorganische Chemikalien

Fa. Merck

D-6100 Darmstadt, Deutschland

Fa. Boehringer Mannheim GmbH

D-6800 Mannheim, Deutschland

Silikonöl AR 20 und AP 18

Fa. Wacker Chemie

D-8000 München, Deutschland

3. Plastikartikel

Fa. Eppendorf

D-2000 Hamburg Deutschland

Fa. Beckman

D-8000 München, Deutschland

Fa. Milian

Genf, Schweiz

4. Tiere

Sprague Dawley Ratten männlich

Fa. Egon Jautz

D-7964 Kisslegg, Deutschland

Zuchtfutter

Fa. Herilan, Kraftfutterwerk H. Eggersmann KG

D-3260 Rinteln, Deutschland

Truthühner

Oberland Putenfarm Deining

D-8021 Deining, Deutschland

METHODEN

Proteinbestimmung nach Biuret (2)

Die Proteinbestimmung wurde in einer Modifikation der Biuret-Methode durchgeführt. 100 µl Probe wurde zur Entfernung der störenden Lipide mit 1 ml Dioxan aufgeschüttelt (5 Minuten) und abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 1 ml 0,3 mol/l Trichloressigsäure erneut 5 Minuten geschüttelt und abzentrifugiert. Zu dem Niederschlag wurde 1 ml Biuret Reagenz gegeben und solange geschüttelt, bis sich das Protein gelöst hatte. Die Probe wurde gegen einen Reagenzienleerwert bei 546 nm im Eppendorf Photometer gemessen, die Proteinprobe mittels eines parallel gemessenen Eichwertes errechnet.

Proteinbestimmung nach Lowry (28)

Das Protein wurde mit Trichloressigsäure gefällt, 10 Minuten stehen gelassen und abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit 1 ml 233 mol/l $NaHCO_3$, 98 mmol/l NaOH, 0,54 mmol/l NaK Tartrat und 0,61 mmol/l $CuSO_4$ aufgenommen. Nach genau 10 Minuten wurden 100 µl Folin-Reagenz (in der Verdünnung 1:2) zugesetzt und bei 37°C 25 Minuten stehen gelassen. Die Reaktion wurde in Eis abgestoppt und die Extinktion bei 578 nm im Zeiss - Photometer bestimmt. Die Proteinmenge wurde an Hand einer parallel gemessenen Eichkurve ermittelt.

Enzymbestimmungen

1. Succinatdehydrogenase (46)

Prinzip:

$$\text{Succinat} + 2(Fe(CN)_6)^{3-} \xrightarrow{SDH} \text{Fumarat} + 2(Fe(CN)_6)^{4-} + 2H^+$$

K-PO_4-Puffer:

K_2HPO_4 0,2 M und KH_2PO_4 0,2 M werden auf einen pH von 7,6 eingestellt.

In den Testansatz von 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,6, 0,083 M EDTA III, 0,015 M KCN, 0,125 M $MgCl_2$ und 0,025 M $K_3(Fe(CN)_6)$ wird die zu testende Substanz gegeben und die Abnahme der Extinktion bei 405 nm in einem Eppendorf Photometer gemessen. Aus der Differenz der Extinktion und dem Eisenverbrauch läßt sich die Aktiviät der Succinatdehydrogenase errechnen.

2. $(Na^+ + K^+)$ATPase (7)

Prinzip:

$$MgATP + H_2O \xrightarrow{ATPase} MgADP + \text{freies Phosphat} + H^+$$

Nachdem die Testsubstanz in einem Ansatz von 0,05 M Trispuffer von pH 7,4, 0,003 M ATP, 0,01 M $MgCl_2$, 0,14 M NaCl, 0,014 M KCl, 0,0005 M EDTA, 0,0001 M g-Strophantin und H_2O zwanzig Minuten bei 37°C inkubiert worden war, wurde die Reaktion durch Zugabe von Trichloressigsäure (TCE) gestoppt. Das bei dieser Reaktion entstandene freie Phosphat wurde in der Phosphatbestimmung nach Fiske

und SubbaRow in einem Eppendorf Photometer bei 578 nm bestimmt. Aus der Menge des gebildeten Phosphats läßt sich die Aktivität der (Na^+ + K^+)ATPase errechnen.

3. Phosphatbestimmung nach Fiske und SubbaRow (8)

Prinzip:

Phosphationen bilden mit Molybdänsäure Phosphomolybdänsäure, die zu Molybdänblau reduziert wird. Die Blaufärbung kann kalorimetrisch in einem Eppendorf Photometer bestimmt werden.

Reagenzien:

$NaHSO_3$	1,4 mmol/l
1-Amino-2-Naphtol-4-sulfonsäure	8,52 mmol/l
Na_2SO_3	39,7 mmol/l
Molybdat	2,5% in 5N H_2SO_4

Die zu testende Substanz wird in einem Ansatz aus Amidol, H_2O und Molybdat bei 37°C 7 Minuten lang inkubiert, die Reaktion durch ein Eisbad gestoppt. In einem Eppendorf Photometer kann bei 578 nm aus der Farbreaktion die Menge des eingesetzten Phosphats errechnet werden.

4. 5'-Nukleotidase (30)

Prinzip:

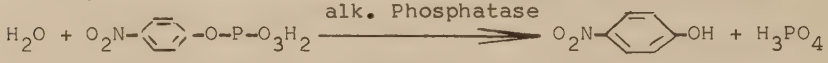
$$5' - AMP \xrightarrow{5'\text{-Nukleotidase}} \text{Adenosin + freies Phosphat}$$

Die Testsubstanz wurde in einem Ansatz von 0,75 M Tris-

puffer, 0,1 M KCl, 0,05 M $MgCl_2$ und 0,05 M 5'-AMP 15 Minuten lang bei 37°C inkubiert, die Reaktion wurde durch Zugabe von Trichloressigsäure gestoppt. Die gebildete Menge freien Phosphats, die eine Berrechnung der Aktivität der 5'-Nukleotidase erlaubt, wurde in der Phosphatbestimmung nach Fiske und SubbaRow ermittelt.

5. Alkalische Phosphatase (52)

Prinzip:



Das durch die alkalische Phosphatase freigesetzte Nitrophenol wurde in einem Eppendorf Photometer bei 405 nm gemessen, wobei aus der Zunahme des 4-Nitrophenols die Aktivität der alkalischen Phosphatase errechnet werden kann.

Leberplasmamembranen nach Neville (33)

1. Lösungen zur Durchführung der Präparation

Als Medium diente 0,001 M $NaHCO_3$.
Saccharoselösungen von verschiedenem Gewicht wurden in Anteilen Gramm Saccharose zu Gramm Wasser mittels eines Refraktometers der Fa. Zeiss bei 20°C geeicht.
Zur Präparation wurden folgende Gradientenlösungen (%=g/g) vorbereitet: 69%, 50%, 44%, 42,3%, 37% und 3%.

2. Präparationsschritte

Alle Präparationsschritte werden bei 4°C durchgeführt.

a) Etwa 10 g Leber der zuvor frisch geschlachteten Tiere werden mit einer Schere zu einer grob breiartigen Masse verarbeitet.
b) Mit einem Dounce-Homogenisator wird die Leber von Hand in 25 ml Medium 8 mal "gepottert". Das so erhaltene Homogenat wird in ein mit 500 ml Medium gefülltes Becherglas gegeben. Die Schritte a und b werden solange wiederholt, bis alle Lebern aufgearbeitet sind.
c) Das gesamte Homogenat wird 3 Minuten mit einem Magnetrührer gerührt, zuerst durch 2 Lagen Gaze und danach durch 4 Lagen Gaze gefiltert.
d) Das Homogenat wird bei maximal 1500 g 30 Minuten lang in einer Sorvall-Zentrifuge abzentrifugiert, der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt.
e) Der Niederschlag wird erneut in Medium aufgenommen,

die Verarbeitungsschritte c und d werden wiederholt.

f) Der Niederschlag wird nun in möglichst wenig Medium aufgenommen und nur 3 mal mit dem Dounce-Homogenisator von Hand "gepottert".

g) Das so gewonnene Homogenat wird mit ca. 35 ml einer 69% Saccharoselösung vermischt und mit einem Zeiss-Refraktometer auf eine 44% ± 0,1%ige Lösung eingestellt.

h) Etwa 26 ml des Homogenats werden in einen Behälter, passend zum Swing-Out Rotor S.W. 27 gegeben und vorsichtig mit ca. 14 ml einer 42,3% ± 0,1%igen Saccharoselösung überschichtet.

i) Die Behälter werden in einem gekühlten Swing-Out Rotor S.W. 27 der Firma Beckman bei 90 000 g 150 Minuten lang ohne Bremsung gefahren.

j) Die nach Beendigung der Zentrifugation obenaufschwimmende Schicht wird vorsichtig abgetragen, in 10 ml Medium aufgenommen und homogenisiert.

k) Nach erneuter Zentrifugation und Homogenisation wird das die Membranen enthaltende Medium auf einen vorher vorbereiteten kontinuierlichen Saccharosegradienten aufgebracht (siehe n).

l) Nach Zentrifugation bei 550 g für 60 Minuten können die gereinigten Membranen, die sich an der Trennschicht zwischen kontinuierlichem und diskontinuierlichem Gradienten angereichert haben, mittels einer Kanüle abgesaugt und nach Homogenisation in

"Cups" aufgeteilt werden.

m) Die Lebermembranen werden sofort in flüßiger Luft eingefroren und verbleiben dort bis zu ihrer Verarbeitung.

n) Mit Hilfe eines Gradientenmischgerätes wird auf einen ca. 3 ml betragenden Grundspiegel 50%iger Saccharose ein kontinuierlicher Gradient von 37% bis 3% aufgebracht.

Lebermembranen nach Cuatrecasas (5)

Die frischen Lebern werden in einem Ultra-Thurax in 0,25 M Sucrose (auf 1 Gramm Leber werden 9 ml Sucroselösung gegeben) dreimal je 10 Sekunden homogenisiert. Das Homogenat wird mit 600 g 10 Minuten lang in einer Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert, der Niederschlag verworfen und der Überstand mit 12 000 g 30 Minuten lang zentrifugiert. Dem entstandenen Überstand werden NaCl und $MgSO_4$ in solcher Menge zugegeben, bis eine 0,1 M NaCl- bzw. 0,2 M $MgSO_4$-Lösung erhalten wird. Dieses Gemisch wird 40 Minuten lang mit 40 000 g zentrifugiert, der Niederschlag in 0,05 M Tris-HCl-Puffer mit einem pH von 7,4 aufgenommen und homogenisiert. Der letzte Schritt wird zur Waschung dreimal wiederholt, die Zentrifugation mit 40 000 g dauert jedoch nur 10 Minuten.

Lipogenese von 2-(^{3}H)Glukose in isolierten Fettzellen nach Moody (31)

1. Lösungen

Puffer I zur Zellaufbereitung

5,1 g NaCl

1,94 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$

2,4 g Tris

0,1 g Glukose

ad 500 ml Aqua bidest,lösen und auf pH 7,8 einstellen.

Für den Gebrauch wird folgende Verdünnung angewandt:

5,0 ml Puffer I

3,5 ml 10%iges Humanalbumin

1,5 ml Aqua bidest

Puffer II

3,5 g NaCl

1,94 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$

2,4 g Tris

0,1 g Glukose

ad 500 ml Aqua bidest, lösen und auf pH 7,2 einstellen.

Für den Gebrauch wird folgende Verdünnung angewandt:

5,0 ml Puffer II

2,0 ml 10%iges Humanalbumin

3,0 ml Aqua bidest

Aufbereitung der Zellen

Es werden 120 g bis 150 g schwere männliche Ratten verwendet. Nach dem Schlachten werden die Fettkörper sofort herausgenommen und in vorbereitete Plastikgläschen gegeben. 4 mg Kollagenase (Code Nr. CLS Worthington) werden in 2 ml Puffer I gelöst, in jedes Gefäß kommen ca. 0,6 g Fettgewebe. Die Proben werden anschließend für 20 Sekunden mit 95%igem O_2 und 5%igem CO_2 begast und schnell verschlossen. Nach 60 Minuten Inkubation bei 37°C werden die freigesetzten Zellen durch einen vorher mit Aqua bidest gewaschenen Nylonstrumpf vom übrigen Gewebe abfiltriert und viermal mit vorgewärmten Puffer II zur Entfernung der Kollagenase gewaschen. Die Zellen werden hierzu 15 Sekunden bei geringer Tourenzahl zentrifugiert, das Medium abgetragen und die Zellen mit 5 ml neuem Puffer aufgewirbelt; der letzte Schritt wird zur Waschung dreimal wiederholt.

Messung der Lipogenese

0,4 ml Zellen werden auf 15 ml mit Puffer II verdünnt und anschließend sofort pipettiert; damit die Zellen in Suspension bleiben, werden diese während des Pipettierens auf einem Magnetrührer schonend bei 37°C gerührt.
In einem Ansatz bestehend aus Insulinverdünnung und Puffer II, der 2-(^{3}H)Glukose enthält, werden die Zellen bei 37°C 120 Minuten inkubiert, die Reaktion wird

durch Zugabe von 8 N H_2SO_4 und/oder Szintillationslösung gestoppt und die Aktivität im Packard Modell 3385 gemessen.
Zum Vergleich der biologischen Aktivität des nativen Insulins mit der des radioaktiv markierten Insulins werden in den Inkubationsansatz einmal natives Insulin und einmal radioaktiv markiertes Insulin eingesetzt und deren Wirkung auf die Umwandlung der Glukose in Gesamtlipide gemessen.

Inkubationsansatz für Lebermembranen

Alle Bindunsversuche werden in 40 mM Trispuffer pH 7,4 unter Zusatz von 2,5 g% Humanalbumin durchgeführt. Pro Ansatz werden 100 µl entsprechend 0,1 mg bzw. 0,2 mg Protein Lebermembranpräparation oder Fettzellsuspension mit radioaktiv markiertem Rinderinsulin allein oder verschiedenen Konzentrationen unmarkiertem Insulin in einem Gesamtvolumen von 500 µl inkubiert. Die spezifische Bindung ist definiert als die Menge Insulin, die gebunden ist, nachdem derjenige Anteil an markiertem Insulin abgezogen wurde, der in Anwesenheit von 4×10^4 ng Insulin/ml unmarkiertem Insulin gebunden wird (= unspezifische Bindung).
Soweit nicht bei den einzelnen Versuchen angegeben, war die Konzentration des radioaktiv markierten Insulins 100 µl/ml im Testansatz. Die Inkubation wird bei 24°C für 30 Minuten ohne Schütteln im Wasserbad durchgeführt.

Methode zur Trennung von gebundenem und ungebundenem Insulin

Fettzellen nach Glieman (16)

400 µl des Testansatzes werden in ein Beckman Mikrofugenröhrchen gegeben, in dem 0,2 ml Dinonylphtalat vorpipettiert sind. Bei Dinonylphtalat handelt es sich um eine Substanz, deren spezifische Dichte geringer ist als die des Inkubationsmediums und größer als die von Fettzellen. Durch Zentrifugation bei 10 000 g für zwei Minuten in der Mikrozentrifuge Typ Beckman wandern die Fettzellen nach oben über die Schicht des Dinonylphtalats, welches das Medium überlagert.
Das Mikrofugenröhrchen kann durch die Schicht des Dinonylphtalats geschnitten werden. Die getrennte Zählung des an die Fettzellen gebundenen Insulins und des im Medium verbliebenen freien Insulins ist daraufhin im Gammazähler der Fa. Packard Instruments möglich.

Lebermembranen

1. Filtrationsmethode (4)
200 µl des Inkubationsansatzes werden auf Celluloseacetat-Filter der Fa. Milipore (EGWP 02500) auf ein Filtrationsgerät mit Wasserstrahlpumpenanschluß aufgebracht und bis zur Trockenheit abgesaugt. Zweimal 10 ml Puffer (40 mM Tris-Puffer pH 7,4) mit Zusatz von

1%igem Humanalbumin werden zur Waschung in kurzen Zeitabständen abgesaugt. Die daraufhin trockenen Filter werden in einem Gammazählgerät gezählt.
Auf Grund unserer Erfahrungen muß bei dieser Methode besonders darauf geachtet werden, daß die Probe möglichst genau auf die Mitte des Filters aufgebracht wird, um eine Kontamination des Kunststoffgerätes am Rande des Filters zu vermeiden. Außerdem muß die Waschung mit kaltem Puffer und das Absaugen in möglichst kurzer Zeit durchgeführt werden, um eine Dissoziation des gebundenen Insulins von der Membran zu verhindern.
Dennoch war die Methode zeitlich ziemlich aufwendig und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nicht gut. Daher entwickelten wir eine neue Methode zur Trennung von gebundenem und ungebundenem Insulin.

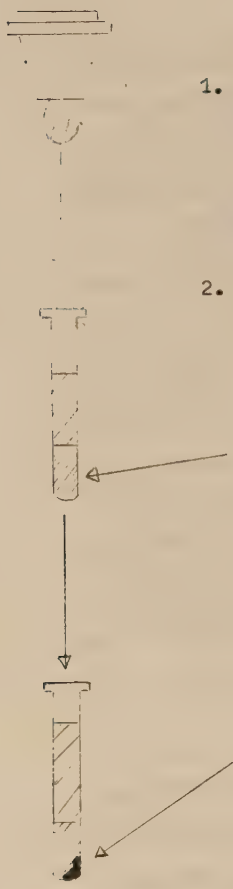
2.Ölmethode (23)
Angeregt durch die Methode von Glieman, bei der Dinonylphtalat zur Trennung der Fettzellen vom Medium verwendet worden war, suchten wir eine Substanz mit folgenden Eigenschaften:

1. Die Substanz sollte mit Wasser nicht mischbar sein und
2. die spezifische Dichte der Substanz sollte größer sein als die vom wässrigen Medium mit Albuminzusatz und geringer als die der Neville-Plasmamembranen.

Nach ausgedehnten Vorversuchen wurde in einer Silikonölmischung (Fa. Wacker Chemie: Silikonöl AR 20 und AP 18) eine solche Substanz gefunden.

Durch dreiminütige Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge eines 400 µl Aliquot des Inkubationsansatzes formt sich ein Niederschlag am Boden des Röhrchens, darüber findet sich die Silikonölschicht (200 µl), die das darüber liegende Medium mit seinem freien Insulin von dem an die Lebermembranen gebundenen Insulin trennt (s. Abb. 1).
Das Mikrofugenröhrchen wird in der Silikonölschicht durchgeschnitten, das freie und gebundene Insulin in einem Gammazähler getrennt gemessen.
Zur Messung des Wassergehaltes des Niederschlages nach Zentrifugation durch das Silikonöl wird zum Inkubationsansatz radioaktiv markiertes Inulin zugegeben und die Radioaktivität nach Zentrifugation im Niederschlag bestimmt.

3. Waschmethode (40)
200 µl des Inkubationsansatzes werden in ein Mikrofugenröhrchen übertragen, in dem sich 200 µl eiskalter Puffer befindet. Nach dreißig Sekunden Zentrifugation in der Mikrozentrifuge wird der Überstand über dem Niederschlag aspiriert. 200 µl des Puffers werden erneut hinzugegeben und nach Zentrifugation abermals aspiriert. Als Puffer dient 40 mM Tris-Puffer pH 7,4. Im gewaschenen Niederschlag wird die Radioaktivität bestimmt.



1. Inkubation ^{125}J-Insulin
   Vol.: 500 µl Tris-Albumin-Puffer als Medium
   Plasmamembranen

   man übertrage 400 µl

2. Trennung von freiem und an Plasmamembranen gebundenem ^{125}J-Insulin

   100 µl Silikonöl Dichte 1,017

   3 Minuten in Beckman Mikrofuge bei
   10 000 g zentrifugieren

   man schneide durch die Ölphase

3. Bestimmung der Radioaktivität

im Niederschlag und Überstand

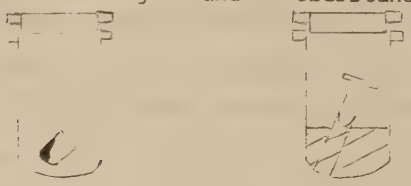


Abbildung 1

Vorgehen beim Bindungsversuch

4. Ultrazentrifugationsmethode

Der Inkubationsansatz wird aufgeteilt:
Je 200 µl werden in der Mikrofuge wie bei der oben beschriebenen Ölmethode abzentrifugiert. 200 µl werden in einem SW 50.1 Rotor der Fa. Beckman mit Adapter 30 Minuten lang bei 100 000 g zentrifugiert und die Radioaktivität des Niederschlages in einem Gammazähler gemessen.

ERGEBNISSE

Überprüfung der Qualität des radioaktiv markierten Insulins

Die Qualität des rakioaktiv markierten Insulins wurde überprüft durch Messung der biologischen Aktivität im Lipogenesetest an Fettzellen der Ratte. In Abbildung 2 ist das Ergebnis dargestellt. Es zeigt sich, daß das von uns verwendete ^{125}Jod-Monoinsulin gegenüber dem verwendeten nativen Rinderinsulin äquipotent ist.

Überprüfung der Methode zur Trennung von gebundenem und ungebundenem Insulin

Das von uns entwickelte Verfahren zur Trennung von gebundenem und ungebundenem Insulin unter Verwendung von Silikonöl wurde mit den in der Literatur bisher beschriebenen Verfahren verglichen.
Die in der Literatur am häufigsten angewendeten Methoden sind die Zentrifugation mit anschließender Waschung des Niederschlages und die Filtrationsmethode (4,40). Abbildung 3 zeigt, daß bei der Bindungsmessung an Lebermembranen über die Zeit in der Bestimmung der spezifischen Bindung keine Unterschiede zwischen den einzelnen Methoden nachweisbar sind. Die unspezifische Bindung differiert allerdings geringgradig bei den einzelnen angewendeten Methoden. Geringgradige Unterschiede der spezifischen Bindung wurden nur beobachtet, solange

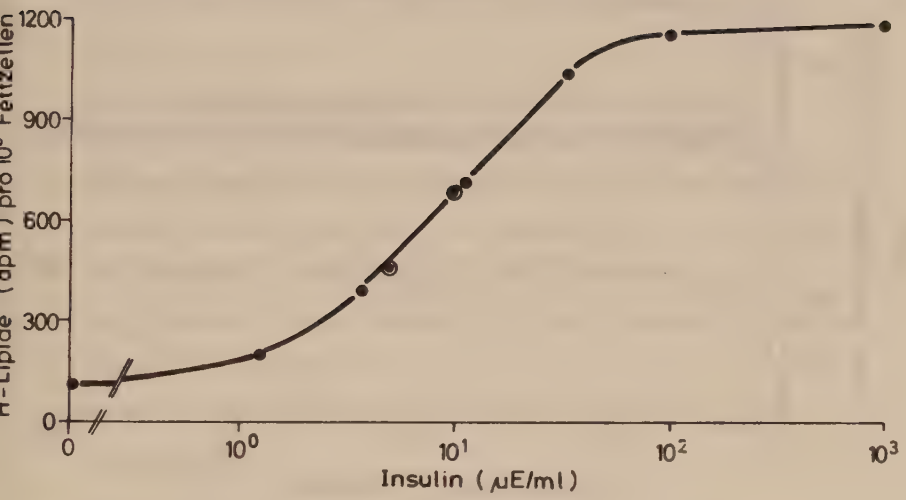


Abbildung 2
Überprüfung der biologischen Gleichwertigkeit von nativem Rinderinsulin (•—•) und ^{125}J-Rinderinsulin (⊙—⊙ eingesetztes markiertes Insulin in Konzentrationen von 7 µE/ml und 10 uE/ml) im Lipogenesetest an Fettzellen der Ratte. Die Versuchsbedingungen sind unter Methoden beschrieben.

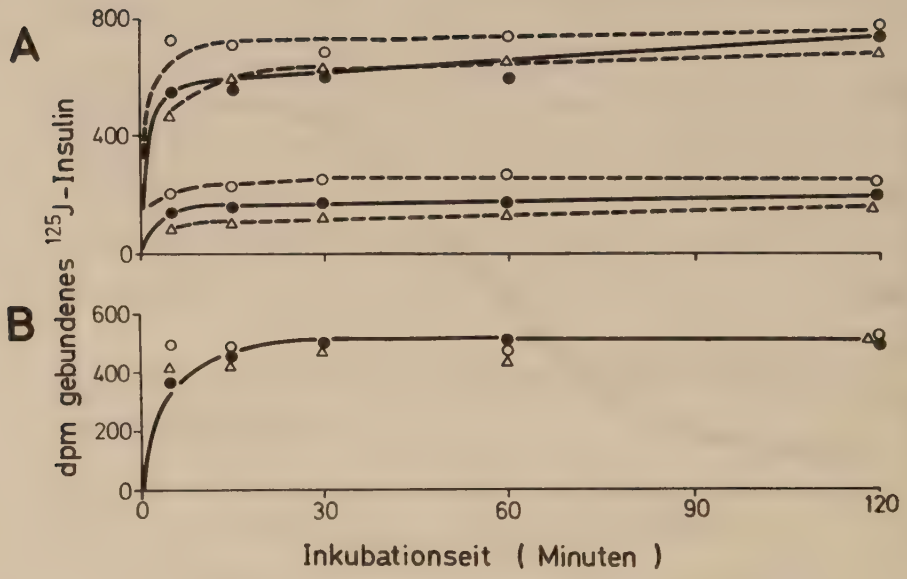


Abbildung 3
Vergleich der verschiedenen Methoden zur Trennung von gebundenem und ungebundenem Insulin.
Ölmethode (•—•), Filtrationsmethode (o--o) und Waschmethode (△—△).
A zeigt die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung getrennt, B zeigt die spezifische Bindung (Gesamtbindung - unspezifischer Bindung).

das Äquilibrium noch nicht erreicht war, und zwar bei Messungen nach fünf Minuten. Außerdem wurde zur Kontrolle eine Ultrazentrifugation für 30 Minuten bei 100 000 g durchgeführt, um sicherzustellen, daß mit der Ölmethode das gesamte Membranprotein durch die Ölschicht wandert.
Bei den Ergebnissen zeigte sich kein Unterschied zwischen Ölmethode und Ultrazentrifugationsmethode (Einzeldaten werden nicht demonstriert). Bei der Überprüfung des Wasseranteils im Niederschlag mit Hilfe der Inulinmethode fand sich, daß der Inulinraum bei der Ölmethode 0,035% beträgt und damit methodisch vernachlässigt werden kann.

Leitenzyme

Tabelle 1 zeigt die Untersuchungen der Leitenzyme der verschiedenen Membranpräparationen. Wie von Plasmamembranen zu erwarten, findet sich eine hohe spezifische Aktivität der ($Na^+ + K^+$)ATPase und der 5'-Nukleotidase, während die Succinatdehydrogenase (SDH) als Leitenzym der Mitochondrien kaum nachweisbar ist.
Der Vergleich der spezifischen Aktivitäten zwischen Ausgangshomogenat und endgültiger Präparation zeigt, daß bei allen drei Tierspezies eine etwa gleiche Anreicherung für Plasmamembranen erreicht wurde.
Es ist aus der Literatur bekannt, daß die spezifischen

	Meerschweinchen			Kalb			Truthuhn		
	H	PM	A	H	PM	A	H	PM	A
5'-Nukleotidase	0,3 ±0,04(4)	1,99±0,36(5)	6,6	1,06±0,13(5)	6,06±1,5(7)	5,6	0,96±0,3(4)	6,6±0,78(4)	6,9
$(Na^+ + K^+)$ATPase	2,52±0,3 (4)	17,76±5,4 (4)	7,0	2,6 ±0,3 (4)	14,0 ±1,2(4)	5,2	7,38±0,5(4)	49,2±2,5 (4)	6,7
alkalische Phosphatase	0,76±0,2 (4)	1,26±0,24(4)	1,6	2,04 (3)	4,8 (3)	2,3	12,0 (3)	13,2 (3)	1,1
Succinatdehydrogenase	0,02 (3)	0 (3)	-	2,45 (3)	0 (3)	-	0,03 (3)	0 (3)	-

Tabelle 1

Spezifische Aktivität der Leitenzyme im Homogenat (H) und in den gereinigten Plasmamembranen (PM) der Lebern der drei Tierspezies in µmol/Minute pro mg Protein (Mittelwerte ± Standardabweichung, die Zahl der Versuche in Klammern). A bezeichnet den Grad der Anreicherung.

Aktivitäten der bekannten Leitenzyme für subzelluläre Strukturen zwischen den einzelnen Spezies sehr unterschiedlich sind (50). Um die Vergleichbarkeit der Membranpräparationen unterschiedlicher Spezies nach der Methode von Neville zu überprüfen, wurden daher nicht nur die spezifischen Aktivitäten der bekannten Leitenzyme für Plasmamembranen und andere Membranstrukturen gemessen ($(Na^+ + K^+)$ATPase, 5'-Nukleotidase als Leitenzyme für die Plasmamembranen, Succinatdehydrogenase für die Mitochondrien und alkalische Phosphatase für die Mikrosomen), sondern es wurde auch der Grad der Anreicherung dieser Enzyme geprüft. Bei allen drei Spezies finden sich sehr unterschiedliche Aktivitäten der Leitenzyme für Plasmamembranen.
Die Aktivitäten (s. Tabelle 1) schwanken von 14,0 µMol/mg Protein/Minute beim Kalb bis 49,2 µMol/mg Protein/Minute beim Huhn für die $(Na^+ + K^+)$ATPase. Auch die Aktivität der 5'-Nukleotidase ist unterschiedlich, 1,99 µMol/mg Protein/Minute beim Meerschweinchen gegenüber 6,6 µMol/mg Protein/Minute beim Huhn. Der Grad der Anreicherung der beiden Leitenzyme für Plasmamembranen ist jedoch sehr ähnlich; bei der Präparation nach Neville wurden die Plasmamembranen aller Spezies um den Faktor 5 bis 7 angereichert. Das Leitenzym der Mikrosomen, die alkalische Phosphatase, findet sich mit unterschiedlicher spezifischer Aktivität in den gereinigten Plasmamembranen; bei Meerschweinchen- und

Kalbslebermembranen findet sich eine geringgradige Anreicherung dieses Enzyms bei der Präparation. Eine Verunreinigung der gereinigten Plasmamembranen durch Mitochondrien ist durch die fehlende Aktiviät des Leitenzyms Succinatdehydrogenase in allen drei Spezies ausgeschlossen.

Nachweis erhöhter Bindung von Puteninsulin an Rattenlebermembranen

Der Nachweis der erhöhten Bindung von Puteninsulin in Parallelität zur biologischen Aktivität wurde bisher nur an den Rezeptoren der Rattenfettzelle erbracht (39,43). Es wurden daher zunächst Vorversuche an Lebermembranen der Ratte durchgeführt, um die Gültigkeit der unterschiedlichen Bindungen in Abhängigkeit der biologischen Aktivität auch an Lebermembranen zu beweisen. Abbildung 4 zeigt die Verdrängung von radioaktiv markiertem Rinderinsulin an isolierten Lebermembranen der Ratte. Um 50% des radioaktiv markierten Rinderinsulins vom Rezeptor zu verdrängen, ist dreimal mehr Rinderinsulin als Puteninsulin notwendig.

Grundcharakteristika der Rezeptoren von Rattenlebermembranen

In Vorversuchen wurde das Rezeptorverhalten der isolierten Rattenlebermembranen näher charakterisiert.
Eine spezifische Eigenschaft des Insulinrezeptors ist

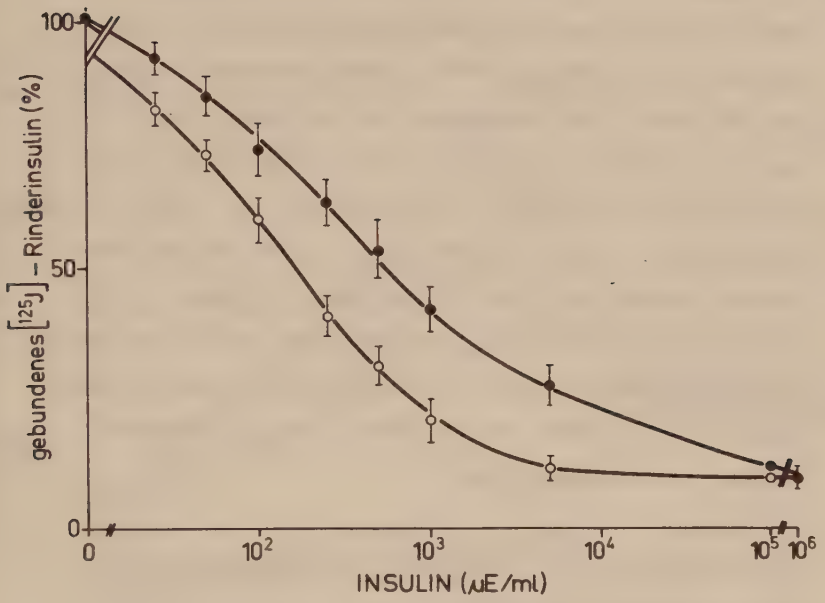


Abbildung 4
Verdrängung von ^{125}J-Rinderinsulin durch Rinderinsulin (•—•) und Puteninsulin (o—o) an Rattenlebermembranen nach Neville. Die Bindung von ^{125}J-Rinderinsulin (100 µE/ml) ohne Zusatz von nativem Insulin wurde gleich 100% gesetzt, die Abszisse gibt die Konzentrationen von zugegebenem nicht markiertem Insulin an. Die einzelnen Punkte repräsentieren die Durchschnittswerte von 6 Experimenten und ihre Standardabweichungen. Die Versuchsbedingungen sind unter Methoden beschrieben.

im Temperaturverhalten nachzuweisen. Wie Abbildung 5 zeigt, findet sich die maximale spezifische Bindung bei 24°C, während sie bei 0°C und 37°C deutlich niedriger liegt. Aus Abbildung 6 ist zu ersehen, daß die spezifische Bindung eine lineare Abhängigkeit von der Menge des eingesetzten Protein aufweist. Wie auch schon von anderen Autoren nachgewiesen, beweist die Abbildung 7, daß die maximale Bindung bereits nach zehn Minuten erreicht wird.
Die Vorversuche mit Rattenlebermembranen wurden auch deshalb durchgeführt, um an diesem Modell die verschiedenen Methoden zur Trennung von gebundenem und ungebundenem Insulin studieren zu können.

Charakterisierung der Rezeptoren von Meerschweinchen-, Hühner-und Kalbslebermembranen

Um die gereinigten Lebermembranen von Meerschweinchen, Huhn und Kalb miteinander vergleichen zu können, wurden zunächst die Grundcharakteristika herausgearbeitet.
Die Insulinrezeptoren der Lebermembranen aller drei Tierspezies zeigten folgende gleiche Grundcharakteristika:
Wie aus Abbildung 8 zu ersehen ist, wurde die maximale spezifische Bindung nach 10-20 Minuten erreicht, die spezifische Bindung war am höchsten bei 24°C, während sie bei 0°C geringer und bei 37°C noch geringer war (s. Abb. 9). Glukagon und Oxytozin in Konzentrationen von 40 µg/ml hatten keinen Einfluß auf die spezifische Bindung (die Daten werden in den Abbildungen nicht aufgeführt), das pH-Optimum lag bei pH 7,8 (s. Abbildung 10).

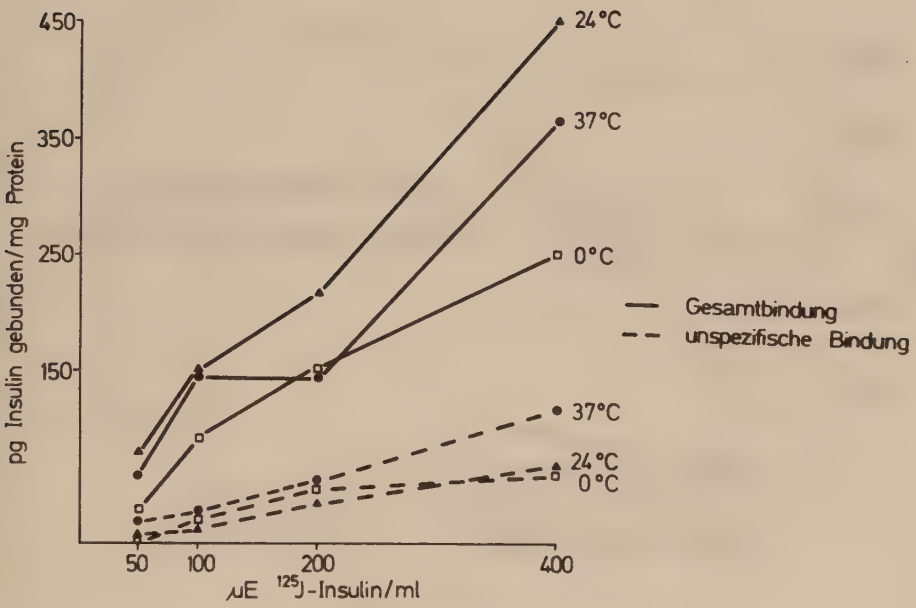


Abbildung 5
Temperaturabhängigkeit der Bindung von ^{125}J-Rinderinsulin an Rattenlebermembranen nach Neville. Die Versuchsbedingungen sind unter Methoden beschrieben.

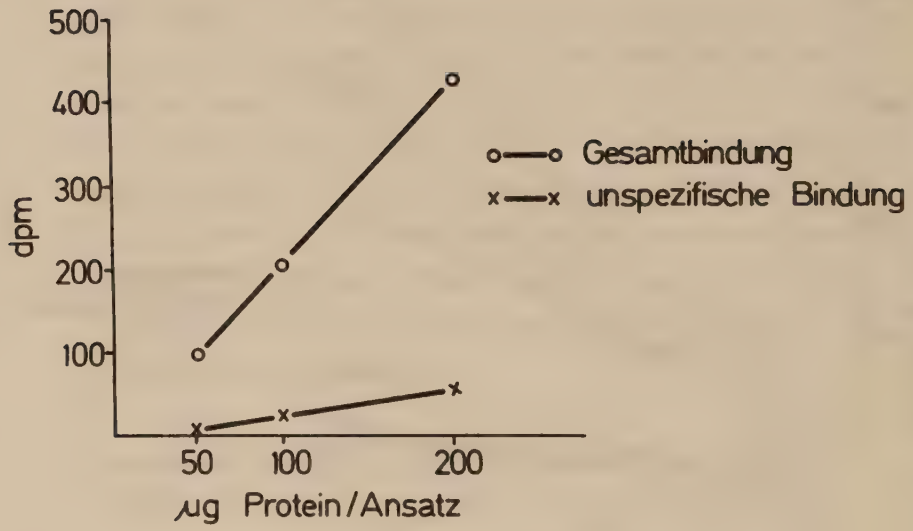


Abbildung 6
Proteinabhängigkeit der Insulinbindung an Rattenlebermembranen nach Neville. Die Versuchsbedingungen sind unter Methoden beschrieben.

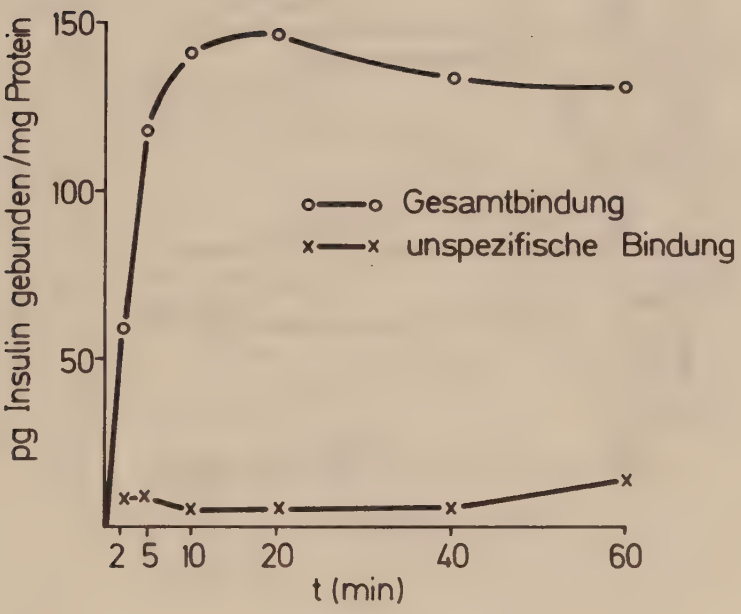


Abbildung 7
Zeitabhängigkeit der Insulinbindung an Rattenlebermembranen nach Neville. Die Versuchsbedingungen sind unter Methoden beschrieben.

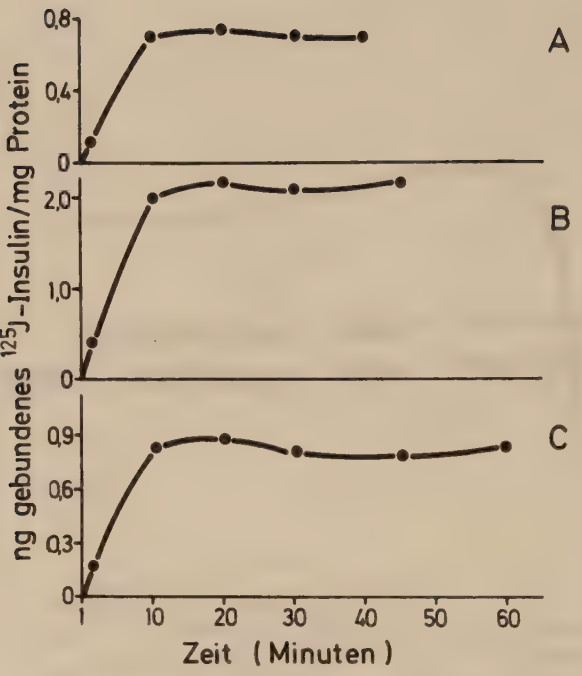


Abbildung 8
Zeitabhängigkeit der spezifischen Insulinbindung an Leberplasmamembranen von Huhn (A), Meerschweinchen (B) und Kalb (C). Die Versuchsbedingungen sind unter Methoden beschrieben.

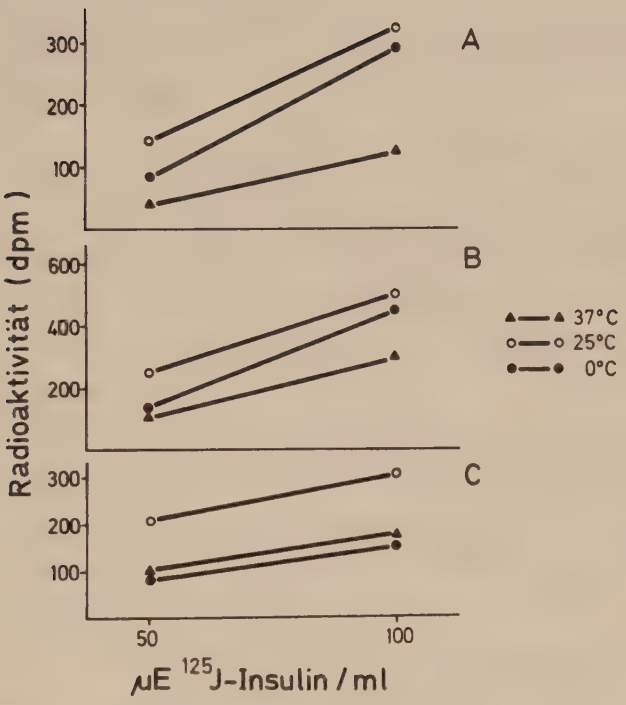


Abbildung 9
Temperaturabhängigkeit der spezifischen Insulinbindung an Leberplasmamembranen von Huhn (A), Meerschweinchen (B) und Kalb (C). In dieser Versuchsanordnung wurde ^{125}J-Rinderinsulin in zwei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Die Versuchsbedingungen sind unter Methoden beschrieben.

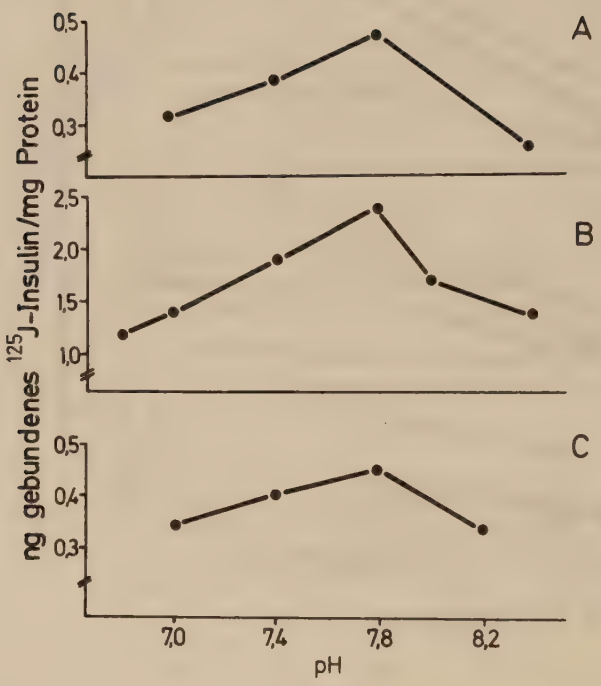


Abbildung 10
pH - Abhängigkeit der spezifischen Insulinbindung an Leberplasmamembranen von Huhn (A), Meerschweinchen (B) und Kalb (C). Zur Versuchsdurchführung wurde Tris-Albumin-puffer auf die entsprechenden pH - Werte geeicht. Die Versuchsbedingungen sind unter Methoden beschrieben.

Einfluß der drei verschiedenen Speziesinsuline auf die Insulinbindung an Lebermembranen von Meerschweinchen, Huhn und Kalb.

Abbildung 11 zeigt die Verdrängung von ^{125}J-Rinderinsulin durch verschiedene Konzentrationen von Meerschweinchen-, Puten- und Rinderinsulin an Leberplasmamembranen von Huhn, Meerschweinchen und Kalb. Die Verdrängungskurve durch Rinderinsulin zeigt die typische sigmoidale Form.

Bei allen drei Tierspezies ist das Meerschweincheninsulin weniger aktiv und das Hühnerinsulin aktiver bei der Verdrängung des radioaktiv markierten Rinderinsulins vom Rezeptor. So braucht man 2,5-5,0fach mehr Rinderinsulin als Puteninsulin, um 50% des radioaktiv markierten Rinderinsulins vom Rezeptor zu verdrängen, während man beim Meerschweincheninsulin die 10fache Menge des Rinderinsulins benötigt, um denselben Effekt zu erzielen. Die Unterschiede in der Verdrängungsaktivität der verschiedenen Speziesinsuline sind hoch signifikant. Beim Meerschweinchen war fünfmal mehr Rinderinsulin als Hühnerinsulin notwendig um 50% des radioaktiv markierten Rinderinsulins vom Rezeptor zu verdrängen, beim Kalb 3,2mal mehr, beim Huhn 2,5mal mehr. Diese Unterschiede der relativen Verdrängungsaktivität waren jedoch statistisch nicht signifikant.

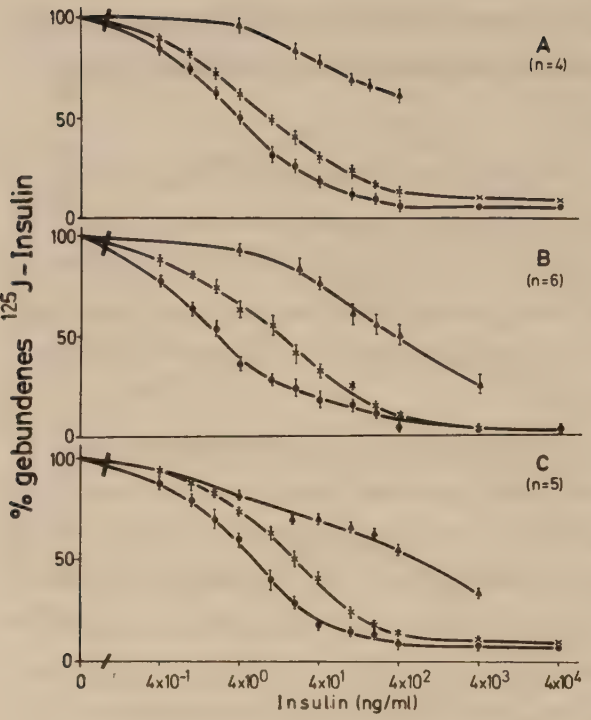


Abbildung 11
Verdrängung von ^{125}J-Rinderinsulin durch verschiedene Konzentrationen von Meerschweincheninsulin (▲—▲), Rinderinsulin (✕—✕) und Hühnerinsulin (●—●) an Leberplasmamembranen von Huhn (A), Meerschweinchen (B) und Kalb (C).
Die Menge radioaktiv markierten Rinderinsulins, die mit einem Einsatz von 100 µE/ml ^{125}J-Rinderinsulin pro Versuchsansatz ohne Zugabe von nativem Insulin an die Plasmamembranen gebunden wurde, wurde gleich 100% gesetzt. In der Abbildung sind die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen und die Zahl der Experimente n aufgetragen. Glukagon und Oxytozin in Konzentrationen von 4 x 10^4 ng/ml zeigten keinen Einfluß auf die spezifische Insulinbindung in allen drei Versuchsgruppen. Die Versuchsbedingungen sind unter Methoden beschrieben.

Die Abbildung 12 zeigt die Verdrängungskurven durch Rinderinsulin bei den Leberplasmamembranen der drei Tierspezies mit Hilfe des Scatchard plots; der Kurvenverlauf ist nicht linear. Unterschiedliche Deutungsmöglichkeiten des Kurvenverlaufes sind möglich: Negative Kooperativität (3,29), Ungleichartigkeit des Hormons (51) und ungleicher Rezeptorbesatz der Membranen mit zwei Rezeptoren hoher und niedriger Affinität (20). Trotz verschiedener Deutungsmöglichkeiten läßt sich folgendes sicher feststellen: Die Steigung der Kurve repräsentiert die Affinität zum Rezeptor, die für das Rinderinsulin bei allen drei Tierspezies dieselbe ist. Die Steigung der Kurve kann durch die Berechnung der K-Werte ausgedrückt werden, wie dies von Kerp und Mitarbeitern beschrieben worden ist (s. Tabelle 2)(24).

Die Rezeptorkapazität der Leberplasmamembranen differiert ganz beträchtlich: Dies ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Kurve aus dem Scatchard plot mit der Abszisse. Meerschweinchenlebermembranen weisen die höchste Bindungskapazität mit 14 ng gebundenes Insulin/mg Protein auf, Hühnerlebermembranen die niedrigste Bindungskapazität (3 ng gebundenes Insulin/mg Protein), während Kalbslebermembranen maximal 7 ng Insulin/mg Protein binden können (s. Tabelle 2).

Die Möglichkeit, daß die Unterschiede in den Bindungskapazitäten durch eine schnellere oder langsamere

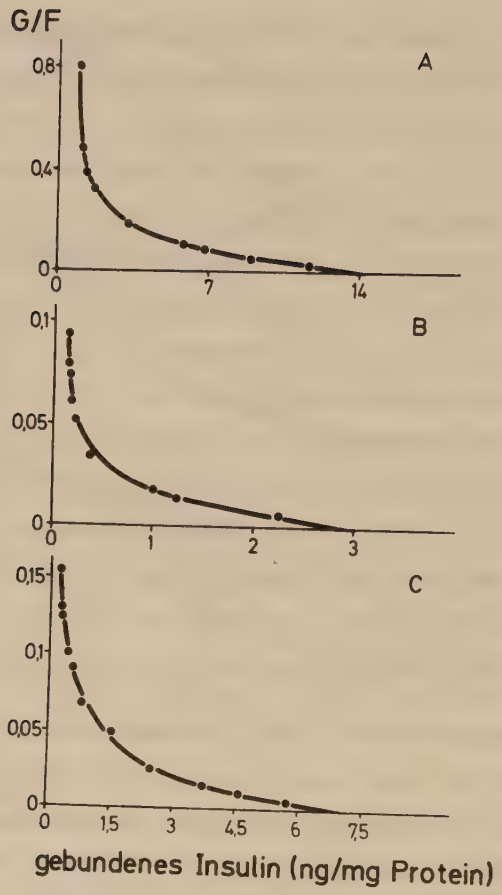


Abbildung 12
Scatchard plot der Bindung von ^{125}J-Rinderinsulin an Leberplasmamembranen von Meerschweinchen (A), Huhn (B) und Kalb (C) in Gegenwart von steigenden Konzentrationen nativen Rinderinsulins.

	Meerschweinchen	Kalb	Huhn
Totale Bindungskapazität in ng/mg Protein	14	7	3
K_1	$3,0 \times 10^{10}$	$2,1 \times 10^{10}$	$2,2 \times 10^{10}$
K_2	$3,2 \times 10^{8}$	$2,7 \times 10^{8}$	$2,9 \times 10^{8}$

Tabelle 2
Totale Bindungskapazität und Affinitätskonstanten für Rinderinsulin an Plasmalebermembranen von Meerschweinchen, Kalb und Huhn

Spaltung des Insulins bedingt sind, wurde durch die Messung des unverbrauchten ^{125}J-Rinderinsulin im Überstand nach Beendigung der Inkubation durch Fällung eines Aliquots mit Trichloressigsäure ausgeschlossen. Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen waren bei allen Experimenten weniger als 5% Insulin abgespalten worden.

DISKUSSION

1. Diskussion der Methoden

Um die vergleichenden Studien in der vorliegenden Arbeit durchzuführen, waren mehrere methodische Probleme zu lösen:

1. Erarbeitung eines geeigneten Verfahrens zur Trennung von gebundenem und ungebundenem Insulin.
2. Untersuchung der Vergleichbarkeit der Präparationen von Plasmamembranen verschiedener Tierspezies.
3. Überprüfung der Eignung des verwendeten ^{125}J-Insulin für die Insulinbindungsstudien.

ad 1

Die in der Literatur bisher beschriebenen Verfahren zur Trennung von gebundenem und ungebundenem Insulin sind entweder arbeitsintensiv oder bieten mitunter technische Schwierigkeiten (4,40). Verwendet wurden bisher hauptsächlich die Filtrationsmethode oder die Zentrifugation des gebundenen Insulins mit anschließender Waschung des Niederschlages (40). Andere Autoren sedimentieren die Plasmamembranen durch eine Schicht von Humanalbumin (40, 41).

Die Verwendung der Filtrationsmethode stößt nach unseren Erfahrungen auf eine Vielfalt von Problemen. So wird nicht nur das gebundene Hormon durch das Filter absorbiert, sondern verschiedene Mengen ungebundenes Hormon können

auch durch das Filter gebunden werden, wobei die Menge des gebundenen Hormons von kleinen Konzentrationsschwankungen des Hormons abhängt.
Nur eine geringe Anzahl der auf dem Markt angebotenen Filter sind für die Methode geeignet und müssen sorgfältig ausgewählt werden. Geringste Unterschiede in der Trennmethode können große Unterschiede in den Ergebnissen herbeiführen. Die methodischen Schwierigkeiten waren teilweise so gravierend, daß dieses Verfahren von verschiedenen Gruppen aufgegeben wurde.
Ebenso waren wir auf technische Schwierigkeiten bei dem Versuch gestoßen, die Zentrifugation und anschliessende Waschung für unsere Versuche anzuwenden. Bei großen Versuchsserien führt offensichtlich die Zeitdifferenz bei den Waschungen zur Loslösung von gebundenem Hormon aus dem Niederschlag, so daß bei den Einzelergebnissen große Streubreiten in Kauf genommen werden mußten. Der gravierendste Nachteil aller bisher bekannten Methoden liegt jedoch in ihrem enormen Zeitaufwand.
Daher wurde von uns ein neues Verfahren zur Trennung von gebundenem und ungebundenem Insulin entwickelt. Das hierbei angewandte Prinzip war, eine Substanz zu finden, die sich mit Wasser nicht mischen sollte, eine höhere spezifische Dichte als das Inkubationsmedium aufweisen sollte und deren spezifische Dichte niedriger sein sollte als die der Plasmamembranen. In einem

Silikonölgemisch wurde diese Substanz gefunden; sie trennt nach Zentrifugation das gebundene vom ungebundenen Insulin. Nach Durchschneiden in der Silikonölschicht können daher gebundenes und ungebundenes Insulin getrennt bestimmt werden. Abbildung 3 beweist, daß dieses Verfahren im Vergleich zu den bisher angewendeten dieselben Resultate lieferte, sobald das Äquilibrium der Bindung erreicht war. Um die Validität der Methode zu überprüfen, wurden zwei weitere Untersuchungen angestellt. Durch Zugabe von radioaktiv markiertem Inulin wurde die Wasserphase der im Niederschlag enthaltenen Plasmamembranen bestimmt, um einen eventuell vorhandenen "Background" an möglicherweise mitgeschlepptem freien Insulin zu erfassen. Nach unseren Ergebnissen ist der Inulinraum quantitativ zu vernachlässigen. Um zu erfahren, ob die Zentrifugationskräfte, die in der Mikrofuge wirksam werden, ausreichen, damit alle Plasmamembranen und mit ihnen alles gebundene Insulin durch die Ölschicht transportiert wird, wurde in parallel durchgeführten Versuchen dieselbe Probe einmal wie üblich in der Mikrofuge drei Minuten lang bei 10 000 g zentrifugiert, ein anderer Teil jedoch dreißig Minuten lang in der Ultrazentrifuge bei 100 000 g zentrifugiert. In den Vergleichsproben fanden sich keine Unterschiede in der gemessenen Insulinbindung an die Membranen.

ad 2

Bei derartigen Vergleichsuntersuchungen taucht die Frage

auf, ob das gewonnene Untersuchungsmaterial und damit die Ergebnisse miteinander vergleichbar sind. Ein möglicher unterschiedlicher Aufbau der Leber könnte zu unterschiedlicher Reinigung von Lebermembranen trotz gleicher Präparationstechnik führen. Die übliche Bestimmung der Leitenzyme 5'-Nukleotidase und ($Na^+ + K^+$)ATPase gibt in diesem Falle keine Auskunft über die Reinheit der Plasmamembranen, da die spezifische Aktivität dieser Enzyme bei verschiedenen Tierspezies unterschiedlich gemessen wurden (50).
Gemessen wurde daher in der vorliegenden Arbeit die spezifische Aktivität der Plasmamarkerenzyme im Ausgangshomogenat und in den gereinigten Plasmamembranfraktionen der Leber. Ein Anstieg der spezifischen Aktivität kann als Maß für die erreichte Reinheit der Plasmamembranen gewertet werden. Tabelle 1 zeigt, daß die Erhöhung der spezifischen Aktivität bei der Präparation nach Neville für alle Tierspezies für die 5'-Nukleotidase und die ($Na^+ + K^+$)ATPase dieselbe war. Vergleichbar waren auch die Anteile der Leitenzyme von Bestandteilen, die als Verunreinigung gelten mußten (Succinatdehydrogenase für die Mitochondrien und alkalische Phosphatase für die Mikrosomen).
Daraus kann geschlossen werden, daß die nach der Methode von Neville gewonnenen Plasmamembranen der Leber der drei untersuchten Tierspezies von vergleichbarer Reinheit sind.

ad 3

Bis auf eine einzige Arbeit, die von Yip 1972 (55) veröffentlicht worden war, wurden alle Untersuchungen von Insulinbindung an Rezeptoren mit ^{125}J-Insulin oder ^{131}J-Insulin durchgeführt. Frühere Studien erbrachten, daß die biologischen und immunologischen Eigenschaften von jodiertem Insulin stark vom Grad der Jodinierung abhängt, und daß die biologischen Charakteristika von Präparationen mit durchschnittlich einem Atom Jod pro Monomer Insulin in der gleichen Größenordnung liegen wie die des nativen Insulins. Freychet, Lambert und Sodoyez (11,26,49) berichten, daß Monojodinsulin an Fettzellen biologisch voll aktiv ist, während Linde und Hansen (27) eine Aktivität von 75% - 85% beschrieben und in einer jüngeren Arbeit von Gammeltoft und Mitarbeitern (14) eine Aktivität von 60% - 80% angegeben wird.

Das in unserer Studie verwendete ^{125}J-Insulin der Fa. NOVO, das nach Jörgensen und Binder (19) präpariert wurde, hatte eine spezifische Aktivität von 20 - 25 Ci/g. Eine Präparation mit dieser niedrigen Jodierungsrate enthält vermutlich ausschließlich zu 10% - 15% Monojodinsulin (19). Dieses Insulin wurde von uns im Lipogenesetest an Fettzellen eingesetzt und zeigte eine 100%ige Aktivität (s. Abbildung 2). Dieses Ergebnis muß nicht unbedingt den Berichten aus der Literatur widersprechen, da beim biologischen Insulintest an Fettzellen eine Variation der relativen biologischen Aktivität von etwa 25% möglich ist.

2. Diskussion der Ergebnisse

Während der Evolution wurde die Primärstruktur des Insulinmoleküls stark abgewandelt (25). Man kann heute als gesichert annehmen, daß der primäre Wirkort des Insulinmoleküls ein spezifischer Rezeptor an der Plasmamembran der Zielorgane des Hormones ist. Man könnte vermuten, daß entsprechende Veränderungen der Primärstruktur des Rezeptors während der Evolution notwendig zu fordern sind, um bei den einzelnen Tierspezies eine adäquate Hormon-Rezeptor-Interaktion am Zielorgan zu ermöglichen. Die chemische Struktur des Insulinrezeptors ist bisher nur grob als Glykoprotein charakterisiert (18). Solange die Isolation des Rezeptors noch nicht erfolgreich durchgeführt werden kann, muß dieser indirekt durch Bindungsversuche analysiert werden.

Eine wesentliche Eigenschaft der bisher charakterisierten Insulinrezeptoren ist die Übereinstimmung der Bindungsaffinitäten derselben mit den biologischen Aktivitäten verschiedener Insuline. So kann die erhöhte biologische Aktivität von Puteninsulin und die erniedrigte Aktivität des Meerschweincheninsulins verglichen mit Rinderinsulin durch deren verschiedene Bindungsaffinitäten an den Rezeptor des Zielorganes erklärt werden (10,22). Die diesbezüglichen Untersuchungen wurden fast ausschließlich an Rattengewebe durchgeführt. Andererseits wurden spezifische Insulinrezeptoren bei einer großen Menge

verschiedener Spezies gefunden: beim Menschen, bei Affen, Ratten, Mäusen, Meerschweinchen, Hasen, Schafen, Schweinen, Truthühnern, Fröschen (21), atlantischen Schleimfischen (31),Hühnern (44) und chinesischen Streifenhamstern (17).
Vergleichende Untersuchungen über Insulinrezeptoren von Tierspezies mit biologisch verschieden wirksamen Insulinen und über deren Interaktion mit dem homologen Insulin sind jedoch nur wenige durchgeführt worden. Damit kann bisher die Frage noch nicht entschieden werden, ob es einen speziesspezifischen Insulinrezeptor gibt, der für die Interaktion mit dem homologen Insulinmolekül spezialisiert ist. Um diese Frage zu beantworten,wurden die drei biologisch verschieden wirksamen Insuline von Meerschweinchen, Kalb und Huhn an den Rezeptoren der Leberplasmamembranen derselben drei Tierspezies untersucht.

In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, daß der Insulinrezeptor eine erstaunliche Gleichförmigkeit aufweist. Man kann heute davon ausgehen, daß innerhalb einer bestimmten Tierspezies die spezifischen Rezeptoren unterschiedlicher Organe wie Leber, Muskel oder Fettgewebe als Erfolgsorgane des Insulins, aber auch Monozyten, Nieren- oder Hirngewebe, bei denen Insulin keine Aktivität aufzeigt, strukturell gleiche Rezeptoren besitzen (s. Übersichtsarbeit Kahn und Roth (21)). Allerdings wurde bisher die Struktur des Insulin-

rezeptors nur sehr indirekt durch verschiedene Eigenschaften charakterisiert, da eine Reinigung des Rezeptors noch nicht gelungen ist. Der Insulinrezeptor ist keine konstante Größe, sondern wird durch verschiedene Einflüße sowohl in seiner Affinität als auch in seiner Kapazität reguliert. Der wesentliche Regulator des Insulinrezeptors ist nach heutiger Auffassung das Insulin selbst. Es findet sich ein reziprokes Verhältnis zwischen Rezeptoren und Insulinspiegeln bei verschiedenen Krankheitsbildern. Damit hat die Untersuchung des Rezeptors klinische Bedeutung erlangt. Bei genetisch diabetischen hyperinsulinämischen Tieren findet sich eine niedrige Rezeptorenzahl an allen Erfolgsorganen, die für die bekannte Insulinresistenz bei diesen Krankheitsbildern verantwortlich gemacht werden kann(21,42). Umgekehrt ist eine Hochregulation des Rezeptors bei Insulinmangel im Tierversuch nachgewiesen (17).

Die Vergleichbarkeit der Insulinrezeptoren verschiedener Organe, sowohl was ihre Grundcharakteristika betrifft, als auch was ihre Regulation betrifft, war Voraussetzung dafür, daß auch am Menschen entsprechende Rezeptorstudien wie im Tierversuch durchgeführt werden konnten. Beim Menschen ist ein Zugang zu den eigentlichen Erfolgsorganen des Insulins nicht möglich; daher wurden die peripheren Monozyten als repräsentatives Modell des Insulinrezeptorbesatzes herangezogen (34,35,36).

Bei diesen Untersuchungen fand sich entsprechend den Tierversuchen eine Herabsetzung der Rezeptoren beim Hyperinsulinismus des Erwachsenendiabetes (1).
Unsere Untersuchungen zeigen, daß die Gleichförmigkeit des Insulinrezeptors nicht nur von Organ zu Organ gegeben ist, sondern von Spezies zu Spezies während der Evolution erhalten blieb. Diese Gleichförmigkeit ließ sich auf Grund verschiedener Untersuchungen nachweisen. Zunächst einmal zeigte sich, daß die Rezeptoren der drei Tierspezies gleiche Grundcharakteristika wie pH-, Temperatur- und Zeitabhängigkeit aufweisen. Das wichtigste Charakteristikum des Insulinrezeptors, nämlich seine Affinität zu Insulinen verschiedener biologischer Aktivität, ein Charakteristikum, das auf die biologische Bedeutung des Rezeptors direkt hinweist, ist bei diesen Tierspezies ebenfalls erhalten. Das Insulin von Puten und Hühnern, das dieselbe Aminosäurensequenz hat (47,54), ist das einzige bekannte Insulin, das eine zwei- bis fünffach höhere Aktivität als das Rinderinsulin aufweist (22,43,54). Diese Eigenschaft könnte durch eine erhöhte Bindungsaffinität zu Fettzellen der Ratte (39), Lebermembranen (39,44) und menschlichen Lymphozyten erklärt werden (44).
Simon und Mitarbeiter (44) haben, soweit wir wissen, als erste Bindungsstudien des Hühnerinsulins am Hühnergewebe durchgeführt. Allerdings fand sich in den Untersuchungen dieser Autoren keineswegs immer eine

höhere Bindungsaffinität des Vogelinsulins zum Hühner-insulinrezeptor im Vergleich zum Rinderinsulin.
Im Gegensatz zu diesen genannten Untersuchungen zeigen unsere Bindungsstudien, daß die Bindungsaffinität der Insuline vom Rind und Huhn stets die Verschiedenheit der biologischen Aktivitäten dieser Insuline reflektiert, unabhängig davon, ob die Bindung an Lebermembranen des Huhnes, des Kalbes oder des Meerschweinchens getestet wurden. Zudem zeigen unsere Studien, daß die deutlich verringerte biologische Aktivität des Meerschweinchen-insulins (gegenüber Hühnerinsulin 160-fach geringer, gegenüber Rinderinsulin 40-fach geringer) stets mit dessen Bindungsaffinität zu den Rezeptoren der drei Spezies korreliert.
Diese im Labor gewonnenen Ergebnisse decken sich gut mit in vivo Studien, bei denen Hühnerinsulin bei Hühnern die Blutzuckerspiegel stärker zu senken vermochte als Rinderinsulin (38), wie auch in Versuchen an Meerschweinchen, in denen das eigene Insulin im Vergleich zum Rinderinsulin eine weitaus geringere blutzuckersenkende Wirkung zeigte (48).
Damit ist ein speziesspezifischer Insulinrezeptor ausgeschlossen. Die erstaunlich hohe evolutionäre Modifikation des Insulinmoleküls scheint nicht von entsprechenden Abwandlungen des Insulinrezeptors begleitet zu sein.

Um eine adäquate Stoffwechselregulation im Falle des Meerschweinchens zu erreichen, dessen Insulin eine vierzigfach erniedrigte Aktivität gegenüber Rinderinsulin aufweist, sind verschiedene Möglichkeiten denkbar.

1. Das Meerschweinchen hat vierzigfach erhöhte Insulinspiegel; diese Möglichkeit ist jedoch durch frühere Untersuchungen ausgeschlossen (48).
2. Die Zielorgane des Meerschweinchens reagieren sensitiver auf das homologe Insulin; hierfür wäre eine erhöhte Affinität der Rezeptoren für das Meerschweincheninsulin zu fordern.
3. Die Rezeptoren des Meerschweinchens sind mit denen anderer Spezies qualitativ gleich, jedoch in größerer Anzahl vorhanden.

Dieselbe Fragestellung, jedoch in umgekehrtem Sinne gälte für das Gewebe und die Interaktion beim Huhn. Nach den vorliegenden Ergebnissen scheint bei den Tierspezies mit Insulinen verschiedener biologischer Aktivität die unter 3. genannte Möglichkeit realisiert zu sein, um eine adäquate Stoffwechselregulation zu erreichen.

Betrachtet man die Bindungskapazitäten der Rezeptoren, die für die Lebermembranen des Meerschweinchens 2,3 pmol Rinderinsulin pro mg Protein, für Lebermembranen von Kälbern 1,2 pmol Rinderinsulin pro

mg Protein und für die Lebermembranen von Hühnern 0,5 pmol Rinderinsulin pro mg Protein beträgt, so erkennt man einen deutlichen Unterschied. Bindungsversuche an Rattenlebermembranen hatten eine maximale Bindungskapazität von 1,4-1,6 pmol Rinderinsulin pro mg Protein ergeben. Diese Ergebnisse decken sich mit Angaben in der Literatur über Rattenlebermembranen (9,20,43) ebenso wie mit denen von Simon und Mitarbeitern über die Plasmalebermembranen von Hühnern (44). Posner und Mitarbeiter beschrieben eine erhöhte Bindungskapazität an Rezeptoren von Plasmamembranen des Meerschweinchens, unabhängig davon, ob es sich dabei um Fett-, Muskel-, Brustdrüsen- oder Lungengewebe handelte, verglichen mit vergleichbaren Membranen bei Ratten, Affen, Hasen, Schweinen und Fröschen (37).

Es scheint zwischen der biologischen Aktivität der Speziesinsuline und den Rezeptorkonzentrationen bei den einzelnen Tierspezies ein umgekehrt proportionales Verhältnis zu bestehen, d. h., bei erhöhter biologischer Aktivität des Hühnerinsulins ist die Rezeptorkapazität sehr niedrig, bei erniedrigter biologischer Aktivität des Meerschweincheninsulins ist die Rezeptorkapazität groß.

Die vorliegende Arbeit könnte die Frage beantworten, wie die verschiedenen Tierspezies an die eigenen Insuline, die eine deutlich verschiedene biologische Aktivität aufweisen, angepaßt sind.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden Insulinbindungsstudien an Leberplasmamembranen von Meerschweinchen, Kalb und Huhn durchgeführt.
Das einzige bisher bekannte Insulin, das gegenüber dem Rinderinsulin eine erhöhte biologische Aktivität aufweist ist das Hühnerinsulin. In früheren Insulinbindungsstudien an Rezeptoren wurde der Nachweis einer erhöhten Bindung des Hühnerinsulins in Parallelität zu seiner biologischen Aktivität erbracht.
Um zu sehen, ob diese Ergebnisse auch auf die Rezeptoren von Leberplasmamembranen zu übertragen sind, stellten wir zunächst Vorversuche an Rattenlebermembranen an.
Es zeigte sich, daß auch hier das Hühnerinsulin eine erhöhte Bindung aufwies; es war dreimal mehr Rinderinsulin als Hühnerinsulin nötig, um 50% des radioaktiv markierten Rinderinsulins vom Rezeptor zu verdrängen.
In Vorversuchen mit Rattenlebermembranen suchten wir nach einer einfachen Methode zur Trennung von gebundenem und ungebundenem Insulin, da die bisher bekannten Methoden entweder zu ungenauen Doppelwerten führten oder zu zeitaufwendig waren. Von uns wurde eine Methode entwickelt, bei der durch eine einfach durchzuführende Kurzzentrifugation der Leberplasmamembranen durch eine Silikonölschicht die Trennung von gebundenem und ungebundenem Insulin erfolgt. Diese neue Methode wurde

kritisch mit den bisher in der Literatur beschriebenen Trennverfahren verglichen.

Bisher waren Verdrängungsstudien mit Insulinen verschiedener Tierspezies an zahlreichen Geweben verschiedener Tiere durchgeführt worden, während Berichte über Untersuchungen der Bindungen von Tierspeziesinsulinen am homologen Rezeptor nur vereinzelt vorliegen.

Wir unternahmen deshalb in dieser Arbeit Vergleichsstudien mit Hühner-, Kälber- und Meerschweincheninsulinen an Leberplasmamembranen dieser drei Spezies.

Um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, mußte zunächst die Reinheit der Präparationen miteinander verglichen werden. Als Kriterium für das Vorliegen von gereinigten Plasmalebermembranen wurden die spezifischen Leitenzyme bestimmt, wie die 5'-Nukleotidase und die ($Na^+ + K^+$)ATPase. Da jedoch aus Veröffentlichungen bekannt ist, daß die Leitenzyme für die Leberplasmamembranen bei den einzelnen Tierspezies unterschiedlich hohe Aktivitäten aufweisen, bestimmten wir die Aktivität im Ausgangshomogenat und in den gereinigten Plasmamembranen. Dabei zeigte sich, daß bei der Präparation nach Neville der Grad der Anreicherung bei allen drei Tierspezies derselbe ist.

Ferner wurden die Grundcharakteristika der Rezeptoren der Lebermembranen der drei Tierspezies herausgearbeitet. Die maximale spezifische Bindung konnte bei allen drei Tierspezies bei 24°C und einem pH von 7,8 nach einer

Inkubation von 10-20 Minuten erreicht werden.
Durch Zugabe von nativem Meerschweinchen-, Rinder- und Hühnerinsulin wurde ^{125}J-Rinderinsulin vom Rezeptor der Leberplasmamembranen vom Meerschweinchen, Kalb und Huhn verdrängt.
Bei allen drei Tierspezies war das Meerschweincheninsulin weniger aktiv und das Hühnerinsulin aktiver als Rinderinsulin bei der Verdrängung des radioaktiv markierten Rinderinsulins vom Rezeptor. 2,5-5,Ofach mehr Rinderinsulin als Hühnerinsulin ist notwendig, um 50% des radioaktiv markierten Rinderinsulins vom Rezeptor zu verdrängen, während beim Meerschweincheninsulin die 10fache Menge gegenüber Rinderinsulin benötigt wird, um denselben Effekt zu erzielen. Die Unterschiede in der Verdrängungsaktivität der verschiedenen Speziesinsuline sind signifikant.
Damit ist ein speziesspezifischer Insulinrezeptor ausgeschlossen. Die erstaunlich starke Modifikation des Insulinmoleküls während der Evolution scheint nicht von entsprechenden Abwandlungen des Insulinrezeptors begleitet zu sein.
Durch Auftragen der Verdrängungskurven für Rinderinsulin in Form des Scatchard plots kann bei den einzelnen Leberplasmamembranen die Rezeptorkapazität bestimmt werden. Diese differiert ganz beträchtlich:
Die Bindungskapazität für Lebermembranen des Meerschweinchens beträgt 2,3 pmol Rinderinsulin pro mg Protein,

für Lebermembranen von Kälbern 1,2 pmol Rinderinsulin pro mg Protein und für Lebermembranen von Hühnern 0,5 pmol Rinderinsulin pro mg Protein.
Es scheint zwischen der biologischen Aktivität der Speziesinsuline und den Rezeptorkonzentrationen bei den einzelnen Tierspezies ein umgekehrt proportionales Verhältnis zu bestehen, d.h., bei erhöhter biologischer Aktivität des Hühnerinsulins ist die Rezeptorkapazität sehr niedrig, bei erniedrigter biologischer Aktivität des Meerschweincheninsulins ist die Rezeptorkapazität groß.

Die vorliegende Arbeit könnte die Frage beantworten, wie die verschiedenen Tierspezies an die eigenen Insuline, die eine deutlich verschiedene biologische Aktivität aufweisen, angepaßt sind.

LITERATURVERZEICHNIS

1 BAR, R.S., GORDON, Ph., ROTH, J., KAHN, C.R., MEYTS, P. De :
Fluctuations in the affinity and concentration of insulin receptors on circulating monocytes of obese patients. Effects of starvation, refeeding and dieting.
In : J. Clin. Invest. 58 (1976), S. 1123 - 1135

2 BEISENHERZ, G., BOLTZE, H.J., BÜCHER, Th., CZOK, R., GARBADE, K.H., MEYER-ARENDT, E., PFLEIDERER, G. :
Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäuredehydrogenase, Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.
In: Z. Naturforschung 8b (1953), S. 555-577

3 BOEYNAEMS, J.M., DUMONT, J.E. :
Quantitative analysis of the binding of ligands to their receptors.
In: J. Cyclic Nucleotide Res. 1 (1975), S. 123 - 142

4 CUATRECASAS, P. :
Insulin-receptor interactions in adipose tissue cells: direct measurement and properties.
In: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68 (1971), S. 1264 - 1268

5 CUATRECASAS, P. :
Isolation of the insulin receptor of liver and fat-cell membranes.
In: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69 (1972), S. 318 - 322

6 CUATRECASAS, P. :
Affinity chromatography and purification of the insulin receptor of liver cell membranes.
In: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69 (1972), S. 1277 - 1281

7 EMMELOT, P., BOS, C.J. :
Studies on plasma membranes.
III. Mg^{2+}-ATPase, (Na^{+}-K^{+}-Mg^{2+})-ATPase and 5'-Nucleotidase activity of plasma membranes isolated from rat liver.
In: Biochim. Biophys. Acta 120 (1966), S. 369 - 382

8 FISKE, C.H., SUBBAROW, Y. :
The colorimetric determination of phosphorous.
In: J. Biol. Chem. 66 (1925), S. 375 - 388

9 FREYCHET, P. :
The interactions of proinsulin with insulin receptors on the plasma membrane of the liver.
In: J. Clin. Invest. 54 (1974), S. 1020 - 1031

10 FREYCHET, P., ROTH, J., NEVILLE, D.M. jr. :
Insulinreceptors in the liver : Specific binding of ^{125}I-insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity.
In: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68 (1971), S. 1833 - 1837

11 FREYCHET, P., ROTH, J., NEVILLE, D.M. jr. :
Monoiodoinsulin: Demonstration of its biological activity and binding to fat cells and liver membranes.
In: Biochem. Biophys. Res. Commun. 43 (1971), S. 400 - 408

12 FREYCHET, P., BRANDENBURG, D., WOLLMER, A. :
Receptor-binding assay of chemically modified insulins. Comparison with in vitro and in vivo bioassays.
In: Diabetologica 10 (1974), S. 1 - 5

13 FREYCHET, P. :
Interactions of polypeptide hormones with cell membrane specific receptors: Studies with insulin and glucagon.
In: Diabetologica 12 (1976)

14 GAMMELTOFT, S., GLIEMANN, J. :
Binding and degradation of ^{125}I-insulin by isolated rat fat cells.
In: Biochim. Biophys. Acta 320 (1973), S. 16 - 32

15 GAVIN, III, J.R., ROTH, J., JEN, Ph., FREYCHET, P. :
Insulin receptors in human circulating cells and fibroblasts.
In: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69 (1972), S. 747 - 751

16 GLIEMANN,J., OSTERLIND, K., VINTEN, J., GAMMELTOFT, S. :
A procedure for measurement of distribution spaces in isolated fat cells.
In: Biochim. Biophys. Acta 286 (1972), S. 1 - 9

17 HEPP, K.D., LANGLEY, J., FUNCKE, H. J.v., RENNER, R., KEMMLER, W. :
Increased insulin binding capacity of liver membranes from diabetic Chinese hamsters.
In: Nature 258 (1975), S. 154

18 JACOBS, S., CUATRECASAS, P. :
The insulin receptor.
In: Hormone-receptor interaction: molecular aspects, hrsg. v. G. S. Levey, New York 1976, S. 31 -45

19 JÖRGENSEN, K.H., BINDER, C. :
^{125}I-insulin as a tracer of insulin in different chemical processes.
In: Labelled proteins in tracer studies, hrsg. v. L. Donato, G. Milhaud, J. Sirchis, Brüssel 1966, S. 329 - 333

20 KAHN, C.R., FREYCHET, P., ROTH, J., NEVILLE, D.M.jr. :
Quantitative aspects of the insulin-receptor interaction in liver plasma membranes.
In: J. Biol. Chem. 249 (1974), S. 2249 - 2257

21 KAHN, C.R., ROTH, J. :
Insulin receptors in disease states.
In: Hormone-receptor interaction: molecular aspects, hrsg. v. G. S. Levey, New York 1976, S. 1 - 29

22 KEMMLER, W., RAGER, K. :
Erhöhte Aktivität des Hühnerinsulins in verschiedenen Testsystemen.
In: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349 (1968), S. 515 - 516

23 KEMMLER, W., RENNER, R., ZYNAMON, A., HEPP, K.D. :
Interactions between insulins and liver membrane receptors of guinea pig, calf and chicken. Exclusion of a species-specific insulin receptor.
In: Biochim. Biophys. Acta 543 (1978), S. 349 - 356

24 KERP, L., STEINHILBER, S., KASEMIR, H. :
Ein Verfahren zum Nachweis insulinbindender Antikörper durch Differentialadsorption.
In: Klin. Wochenschr. 10 (1966), S. 560 - 567

25 KLOSTERMEYER, H., ZAHN, H. :
Struktur des Insulins. I. Strukturformel.
In: Insulin, Teil 1 hrsg. v. E. Dörzbach, Berlin-Heidelberg-New York 1971, S. 274 - 278

26 LAMBERT, B., FELIX, J.M., JACQUEMIN, C. :
Préparation contrôlée de monoiodoinsuline active ou inactive biologiquement.
In: C.R. Acad. Sc. Paris D. 275 (1972), S. 711 - 714

27 LINDE, S., HANSEN, B. :
Preparation and characterization of monoiodoinsulin.
In: Int. J. Peptide Protein Res. 6 (1974), S. 157 - 163

28 LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R. J. :
Protein measurement with the Folin Phenol Reagent.
In: J. Biol. Chem. 193 (1951), S. 265 - 275

29 MEYTS, P. De, ROTH, J., NEVILLE, D.M.jr.,
GAVIN, III,J.R., LESNIAK, M.A. :
Insulin interactions with its receptors:
Experimental evidence for negative cooperativity.
In: Biochem. Biophys. Res. Commun. 55 (1973),
S. 154 - 161

30 MICHELL, R.H., HAWTHORNE, J.N. :
The site of diphosphoinositide synthesis in rat liver.
In: Biochem. Biophys. Res. Commun. 21 (1965),
S. 333 - 338

31 MOODY, A.J., STAN, M.A., STAN, M., GLIEMANN, J. :
A simple free fat cell bioassay for insulin.
In: Horm. Metabol. Res 6 (1974), S. 12 - 16

32 MUGGEO, M., GINSBERG, G.H., ROTH, J., MEYTS, P.De :
The insulin receptor and insulin of the
atlantic hagfish.
In: Diabetes 26, Suppl. 1 (1977), S. 353

33 NEVILLE, D.M.jr. :
Isolation of an organ specific protein antigen
from cell-surface membrane of rat liver.
In: Biochim. Biophys. Acta 154 (1968), S. 540 - 552

34 OLEFSKY, J.M., REAVEN, G.M. :
The human lymphocyte: A model for the study
of insulin-receptor interaction.
In: J. Clin. Endocrinol. Metab. 38 (1974), S. 554 - 560

35 OLEFSKY, J. M., REAVEN, G.M. :
Insulin binding to monocytes and total mononuclear
leukocytes from normal and diabetic patients.
In: J. Clin. Endocrinol. Metab. 43 (1976), S. 226 - 228

36 OLEFSKY, J.M., REAVEN, G.M. :
Effects of sulfonylurea therapy on insulin binding
to mononuclear leukocytes of diabetic patients.
In. Am. J. Med. 60 (1976), S. 89 - 95

37 POSNER, B.J., KELLY, P.A., SHIN, R.P.C., FRIESEN, H.G. :
Studies of insulin, growth hormone and prolactin
binding: Tissue distribution,species variation
and characterization.
In: Endocrinology 95 (1974), S. 521 - 531

38 RAGER, K., SCHAUDER, P., KEMMLER, W. :
Wirkung des Hühnerinsulins am Huhn.
In: Z. Gesamte Exp. Med. 151 (1969), S. 261 - 270

39 RENNER, R., KEMMLER, W. :
Mechanism of the increased biological activity
of turkey insulin.
In: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355 (1974),
S. 1555 - 1556

40 RODBELL, M., MICHIEL, H., KRANS, J., POHL, S.L., BIRNBAUMER, L. :
The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver.
In: J. Biol. Chem. 246 (1971), S. 1861 - 1871

41 ROTH, J. :
Peptide hormone binding to receptors: a review of direct studies in vitro.
In: Metabolism 22 (1973), S. 1059 - 1073

42 ROTH, J., KAHN, C.R., LESNIAK, M.A., GORDON, Ph., MEYTS, P.De, MEGYESI, K., NEVILLE, D.M.jr., GAVIN, III, J.R., SOLL, A.H., FREYCHET, P., GOLDFINE, I.D., BAR, R.S., ARCHER, J.A. :
Receptors for insulin, NSILA-s, and growth hormone: applications to disease states in man.
In: Recent progress in hormone research, hrsg. v. R.O. Greep, New York-San Francisco-London,1976, S. 95

43 SIMON, J., FREYCHET, P., ROSSELIN G. :
Chicken insulin: Radioimmunological characterization and enhanced activity in rat fat cells and liver plasma membranes.
In: Endocrinology 95 (1974), S. 1439 -1449

44 SIMON, J., FREYCHET, P., ROSSELIN, G. :
A study of insulin binding sites in the chicken tissue.
In: Diabetologica 13 (1977), S. 219 - 228

45 SIMON, J., FREYCHET, P., ROSSELIN, G., MEYTS, P.De :
Enhanced binding affinity of chicken insulin in rat liver membranes and human lymphocytes: Relationship to the kinetic properties of the hormon-receptor interaction.
In: Endocrinology 100 (1977) S. 115 - 121

46 SINGER, T.P., BERNATH, P., LUSTY, C.J. :
Succinatdehydrogenase.
In: Methoden der enzymatischen Analyse, hrsg. v. H.U. Bergmeyer, Weinheim 1970, S. 1572 - 1575

47 SMITH, L.F. :
Species variation in the amino acid sequence of insulin.
In: Am. J. Med. 40 (1966), S. 662 -666

48 SMITH, L.F. :
Amino acid sequences of insulins.
In: Diabetes 21, Suppl. 2 (1972), S. 457 - 460

49 SODOYEZ, J.C., SODOYEZ-GOFFAUX, F., GOFF, M.M., ZIMMERMANN, A.E., ARQUILLA, E.R. :
^{127}I- or carrier-free ^{125}I-monoiodoinsulin, Preparation, physical, immunochemical and biological properties and susceptibility to "insulinase" degradation.
In: J. Biol. Chem. 250 (1975), S.4268 - 4277

50 SOLYOM, A., TRAMS, E.G. :
Enzyme markers in characterization of isolated plasma membranes.
In: Enzyme 13 (1972), S. 329 -372

51 TAYLOR, S.I. :
Binding of hormones to receptors: An alternative explanation of nonlinear scatchard plots.
In: Biochemistry 14 (1975), S. 2357 - 2361

52 WALTER, K., SCHÜTT, Ch. :
Alkalische Phosphatase.
In: Methoden der enzymatischen Analyse, hrsg. v. H.U. Bergmeyer, Weinheim 1970, S. 823 - 826

53 WEITZEL, G., OERTEL, W., RAGER, K., KEMMLER, W. :
Insulin vom Truthuhn.
In: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350 (1969), S. 57 - 62

54 WEITZEL, G., RENNER, R., KEMMLER, W., RAGER, K. :
Struktur und erhöhte Aktivität des Insulins vom Truthuhn.
In: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353 (1972), S. 980 - 986

55 YIP, C.P. :
Preparation of 3H-insulin and its binding to liver plasma membrane.
In: Insulin action, hrsg. v. I.B. Fritz (1972), S. 115 - 136

LEBENSLAUF

Am 14. Dezember 1950 wurde ich in München geboren. Meine Eltern sind Nikolaj Zynamon und Alexandra Zynamon, geborene Resnitschenko.

1957 - 1961	Grundschule in München
1961 - 1970	Gymnasium in München
1970	Abitur
1970 - 1977	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians Universität in München
1977	Staatsexamen an der Ludwig-Maximilians Universität in München
1978	Approbation zum Arzt
seit 1978	Assistenzarzt an der II. Medizinischen Abteilung, Chefarzt Dr. Venhofen, Krankenhaus III. Orden, München
1974 - 1979	Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit am Institut für Diabetesforschung in München unter der Anleitung von Prof. Dr. H. Mehnert